

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.00216

大豆丙二烯氧化物合酶基因(*GmAOS*)及其启动子的克隆与分析

吴娟娟^{1,2} 吴倩¹ 喻德跃^{1,*}

¹ 南京农业大学国家大豆改良中心 / 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏南京 210095; ² 南通大学医学院生化教研室, 江苏南通 226001

摘要: 利用 RT-PCR、RACE 和 LA PCR 相结合的方法, 从大豆中克隆了 *GmAOS* 基因及其启动子序列(登录号为 EU366252), *GmAOS* 基因共 1 789 bp 碱基, 等电点 8.97, 分子量 58.3 kD, 在 3 种不同抗性大豆材料中均有 2 个拷贝。生物信息学分析表明, *GmAOS* 酶的 N 末端有典型叶绿体定位信号肽, 基因序列上有多个丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸的磷酸化位点。该研究克隆到 ATG 上游 472 个碱基的 *GmAOS* 基因启动子部分序列, 其含有赤霉素的响应元件(TAACAA), 可诱导性抗性基因响应元件(W box), 细菌和盐诱导的响应元件(GAAAAA), 茉莉酸诱导的响应元件(G box)。 *GmAOS* 能强烈响应茉莉酸的诱导, 且在黄皮小青豆(高抗斜纹夜蛾)中表达量高于徐瞳大豆, 两种材料抗虫性的差异可能是由 *GmAOS* 基因受诱导后的表达量差异引起的, 即 *GmAOS* 基因与作物抗虫性相关, 可作为培育高诱导抗性材料的候选基因。

关键词: 大豆; 丙二烯氧化物合酶; 启动子; 克隆; 生物信息学分析

Cloning and Characterization of *GmAOS* Gene and Its Promoter in Soybean (*Glycine max*)

WU Juan-Juan^{1,2}, WU Qian¹, and YU De-Yue^{1,*}

¹ National Center for Soybean Improvement / National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ² Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical School of Nantong University, Nantong 226001, China

Abstract: Allene oxide synthase (AOS) is a major intermediate enzyme in octadecanoid pathway to JA biosynthesis affecting the synthesis and levels of all JA-related compounds in plants, and therefore plays a significant role in plant defense. In this study, a full length cDNA of *GmAOS* and its promoter were cloned from the soybean (*Glycine max*) by RT-PCR, RACE, and LA PCR methods. *GmAOS* cDNA coding 519 amino acids (58.3 kD) with an isoelectric point of 8.97 and two genes copies in the soybean genome coding for *GmAOS*. Bioinformatics analysis indicated that the N-terminal region of *GmAOS* displayed features of a typical chloroplast targeting peptide including an enrichment of serine, threonine and tyrosine phosphorylation sites. The length of the promoter was 472 bp, containing several stress-induced elements: GA inducing elements (TAACAA), W-box element which was in response to elicitor-responsive transcription of defense genes, element responsive to salt and pathogen (GAAAAA) and G-box (CACGTG) induced by JA. Jasmonic acid showed a strong inducement of the *GmAOS* transcript level, expression patterns of *GmAOS* were explored in two soybean accessions with distinct resistance to cotton worm: XTDD was highly susceptible and HPXQD highly resistant, showing that *GmAOS* had higher transcript level in HPXQD(HR) than in XTDD(HS). *GmAOS* transcript level were correlated with soybean material resistance grades. These results suggest *GmAOS* is likely to be a useful tool for improving self-resistance ability of high plants.

Keywords: Soybean; Allene oxide synthase; Promoter; Clone; Bioinformatics analysis

丙二烯氧化物合酶(allene oxide synthase, AOS, EC.4.2.1.92)^[1]普遍存在于植物组织中, 属于 P450 超基因家族中的一员, 具有 CytP450 家族的普遍特征, 是茉莉酸(jasmonic acid, JA)合成的关键酶^[2-3], 可以

通过控制 JA 的生物合成而参与调节植物的许多生理过程。徐涛等^[4]在研究水稻的虫害诱导防御体系时发现, 斜纹夜蛾危害能够明显诱导水稻茉莉酸合成途径的关键酶脂氧合酶和丙二烯氧化物合酶基因

本研究由国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2010CB125906)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 喻德跃, E-mail: dyu@njau.edu.cn, Tel/Fax: 025-84396410

第一作者联系方式: E-mail: woshijw@126.com

Received(收稿日期): 2010-07-02; Accepted(接受日期): 2010-09-28.

表达。伤害可以诱导番茄叶片 *AOS* 基因的表达^[5], *AOS* mRNA 水平最大时可达达到相应对照的 5~9 倍。可见, *AOS* 基因表达的加强对提高植物对物理环境的适应和种间竞争能力, 抵御天敌侵害, 增强抗病性等方面起着重要作用。目前, 在许多作物中克隆了 *AOS* 基因并进行了相关功能的研究, 但是 *AOS* 基因在大豆中的研究还比较少。虽然 Kongrit 等^[6]克隆了 2 个大豆 *AOS* 基因, 但是只报道了基因序列、酶活性测定和简单的组织表达, 关于大豆 *AOS* 基因的定位, 与其他作物 *AOS* 基因的进化关系, 拷贝数及其启动子等均没有报道。

为了解大豆 *GmAOS* 基因在逆境胁迫中所起的作用及 *GmAOS* 基因及启动子的特性, 本研究通过 RT-PCR 以及 RACE 等方法从大豆中克隆了 *GmAOS* 基因, 利用 LA PCR 法分离了 *GmAOS* 基因的启动子序列(*GmAOS* 基因和启动子登录号为 EU366252), 用生物信息学方法分析 *GmAOS* 基因序列的特点和启动子的顺式元件, 用茉莉酸诱导两种对斜纹夜蛾抗性差异显著的大豆材料, 分析了 *GmAOS* 基因在两种材料中的表达差异, 用 Southern blot 分析了 *GmAOS* 基因的拷贝数。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

大豆(*Glycine max* L. Merr.)品种黄皮小青豆(高抗斜纹夜蛾)、徐瞳大豆(高感斜纹夜蛾)和野生豆 ZYD3693 由国家大豆改良中心提供, 于正常季节种植于南京农业大学网室中, 常规田间管理。取六复叶期的大豆叶片, 液氮速冻存于-80℃备用。

1.2 大豆基因组 DNA、总 RNA 的提取纯化和 cDNA 第一链的合成

采用 CTAB 法小量提取大豆基因组 DNA, 采用 Trizol 试剂(Invitrogen, USA)提取大豆总 RNA, 经过 DNase I (TaKaRa 公司)处理后进行 cDNA 第一链的合成(Promega, USA), -20℃保存备用。

1.3 *GmAOS* 基因的克隆

利用截叶苜蓿 *AOS* 基因全长序列搜索 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), 得到与 *AOS* 有相似性的大豆 dbEST(BG652002), 验证预测的准确性。根据测序结果在 Tigr (<http://www.tigr.org/>)运用 Blast 比对得到高度同源的 TC207123, 设计引物, 上游为 5'-TATCACGCTCCCTCTTCAAC-3'; 下游为 5'-AGTAACGGAAGAACCCAAGG-3'。扩增程序为

95℃预变性 2 min, 94℃ 30 s, 52℃ 60 s, 72℃ 60 s, 30 个循环, 72℃延伸 10 min。

利用 3'-Full RACE Core Set 试剂盒(TaKaRa 公司)和 5'RACE 试剂盒(Clontech 公司, BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit)根据说明书分别设计引物, 快速扩增 cDNA 末端。根据 RACE-PCR 的结果, 设计覆盖完整 ORF 的引物序列(*GmAOS* 上游引物: 5'-ACACCCAAAATGGCATCCTC-3', 下游引物: 5'-TCATCATCCTAACCGGTCAA-3'), 以 DNA 和 cDNA 为模板同时扩增 *GmAOS* 的 ORF, 扩增程序同前文, 将扩增产物克隆至 pGEM-T 载体, 由 Invitrogen 公司测序。

1.4 *GmAOS* 基因启动子序列的克隆

采用 LA PCR in vitro Cloning Kit (TaKaRa 公司)克隆基因的启动子, 设计引物 S1: 5'-AGAGCGT TGTGGTTGAGGAG-3', S2: 5'-GAAATAGTCTT GGCGGTCCTT-3', 按照说明书操作。

1.5 半定量 RT-PCR 分析

以大豆组成型表达的 *Actin* 基因(GenBank 登录号为 V00450)为内部参照, 利用黄皮小青豆(HPXQD), 高抗斜纹夜蛾(HR); 徐瞳大豆(XTDD), 高感斜纹夜蛾(HS), 以茉莉酸诱导胁迫后, 分别提取总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR 分析。*Actin*: 上游引物为 5'-GTTCTCTCCTTGATGCAAGTG-3', 下游引物为 5'-CCAGACTCATCATATTCACCTTTAG-3'。*GmAOS* 上游引物为 5'-TCTCCATCAGAGCCTC GGTC-3', 下游引物为 5'-CATCATCCTAACCGGTC AAAAAC-3'。扩增程序为 95℃预变性 5 min, 94℃ 30 s, 56℃ 50 s, 72℃ 60 s, 30 个循环, 72℃延伸 10 min; *GmAOS* 基因退火为 60℃ 1 min。为减小误差, 每份 DNA 样品分别做 3 次 PCR, 3 次电泳。用 Band Leader 3.0 (<http://www.bio-soft.net/draw/BandLeader.htm>)完成胶灰度图的数据化, 取电泳胶灰度图的 3 次平均值用于做柱状图; *GmAOS* 基因柱状图用 *GmAOS* 基因与 *Actin* 基因表达量数据化的比值表示。

1.6 Southern blot 分析

采用 CTAB 法提取大豆叶片基因组 DNA, 分别用 *Xba* I, *Dra* I, *Xho* I 和 *Pvu* II 于 37℃酶切 12 h, 琼脂糖凝胶电泳, 进行 Southern blot 杂交。Southern 杂交及探针标记等参见 Roche 公司的 DIG 试剂盒提供的操作程序; 限制性内切酶购自 TaKaRa (大连)公司。

1.7 生物信息学分析

GmAOS 蛋白的分子量和等电点由经在线软件

Compute pI/Mw tool, ExPASy (http://expasy.org/tools/pi_tool.html)预测; CholorP version 1.1 (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/CholorP/>)用于预测 GmAOS 蛋白的信号肽; 利用 NetPHos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)软件分析 GmAOS 蛋白的磷酸化作用位点; MotifScan 程序(http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)用于搜寻 GmAOS 序列中的可能基序; 多序列比对由 ClustalX 程序(Ver.1.83) (<http://www.ibio.com/soft/biosoft/2009/7400.html>)和 GeneDOC 程序(Ver.2.6) (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>)进行; MEGA 程序(Ver.4.0)(<http://www.megasoftware.net/>)用于系统发生分析。PredictProtein (<http://www.predictprotein.org/>)用于 GmAOS 蛋白质二级结构预测; MaInspector (<http://www.genomatix.de/en/index.html>)程序用于 GmAOS 启动子分析。

2 结果与分析

2.1 大豆 GmAOS 基因的克隆与序列分析

以徐瞳大豆 cDNA 为模板, 通过 RT-PCR 的方法克隆 dbEST (BG652002), 得到大小为 467 bp 的片段; 根据测序结果在 Tigr 运用 Blast 比对得到高度同源的 TC207123, 扩增得到 866 bp 的片段(图 1-A); 根据此克隆的序列, 利用 3'RACE 引物和 3'RACE 巢式引物, 扩增得到 575 bp 的片段(图 1-B); 利用 5'RACE 引物和 5'RACE 巢式引物, 胶回收后得到 729 bp 的片段(图 1-C); 将扩增得到的片段拼接后, 设计引物同时在 cDNA 和 gDNA 中扩增得到大小为 1 789 bp

序列(图 1-D), 该序列 5'端已经包含起始密码子且符合 Kozak 规则^[7], 3'端有典型的 poly(A)加尾信号, 包含完整的 ORF, 编码 519 个氨基酸残基, 没有内含子, 将该基因在 NCBI 上注册定名为 GmAOS, 登录号为 EU366252。经在线软件分析 GmAOS 蛋白等电点为 8.97; 分子量为 58.3 kD (Compute pI/Mw tool, ExPASy)。之后, 发现 NCBI 文库刚新增加了 2 个大豆 GmAOS1 和 GmAOS2 基因, 且 GmAOS2 基因与 GmAOS 基因序列大部分相同。Kongrit 等^[6]只报道了酶活测定和简单的组织表达, 关于大豆 GmAOS 基因的启动子, 大豆 AOS 基因的定位, 与其他作物的 AOS 基因进化关系, 拷贝数等均没有报道, 本文对 GmAOS 基因做了进一步的研究。

2.2 GmAOS 序列的生物信息学分析

在以往的报道中, 亚麻^[8]、大麦^[9]、番茄^[10]、拟南芥^[11]的 AOS 蛋白定位于叶绿体内膜。利用 CholorP (Ver. 1.1)软件预测大豆的 GmAOS 基因信号肽 MASSASTTLSSPFLRLE FPSSTKQRSSISIR。软件分析表明 GmAOS 蛋白序列的 N 末端有大量羟基化的氨基酸(前 31 个氨基酸含有 9.68% T 和 32.3% S), 显示了典型叶绿体定位信号肽(图 2), 定位于叶绿体的可能性为 89.9% (CholorP Ver. 1.1 软件预测), 这与以往的报道一致。

利用 NetPHos 2.0 软件分析发现 GmAOS 蛋白有多个得分很高的磷酸化作用位点, 分别是丝氨酸(6、20、21、26、27、29、33、35、44、47、51、130、145、156、161、178、209、359、495、503、513

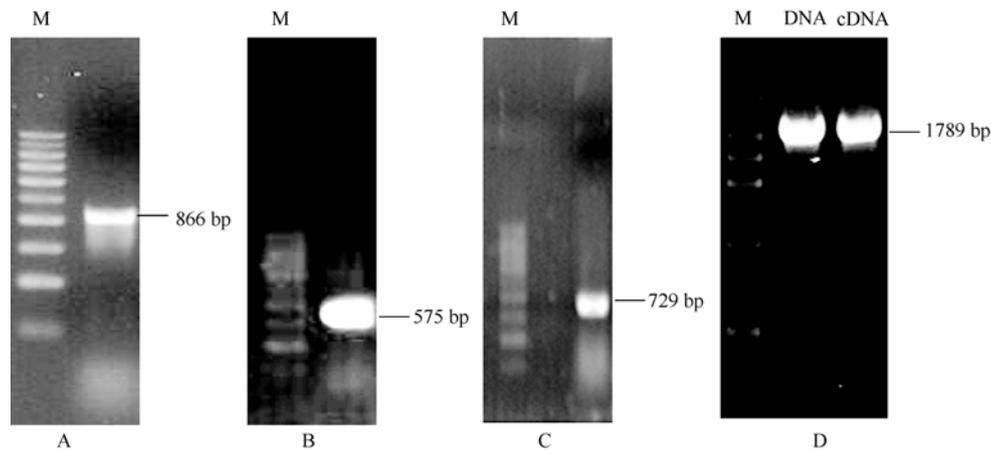


图 1 大豆 GmAOS 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of GmAOS from soybean

A: TC207123 的片段; B: GmAOS 3'RACE 扩增; C: GmAOS 5'RACE 扩增; D: GmAOS 在 cDNA 和 gDNA 中的扩增。

A: TC207123 obtained by PCR; B: 3' terminal of GmAOS obtained by 3'RACE; C: 5' terminal of GmAOS obtained by 5'RACE; D: ORF of GmAOS obtained from genomic DNA and cDNA.

和 518), 苏氨酸(96、234、268、271、307、425 和 462)和酪氨酸(283 和 291)(图 2)。丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸磷酸化激酶在信号转导中起着重要的作用,

它们强大的生理催化活性可以满足范围很广的生理要求, 包括转导细胞外的生长、分化刺激以及细胞对胞内氧化还原势的响应等功能。*GmAOS* 蛋白序列

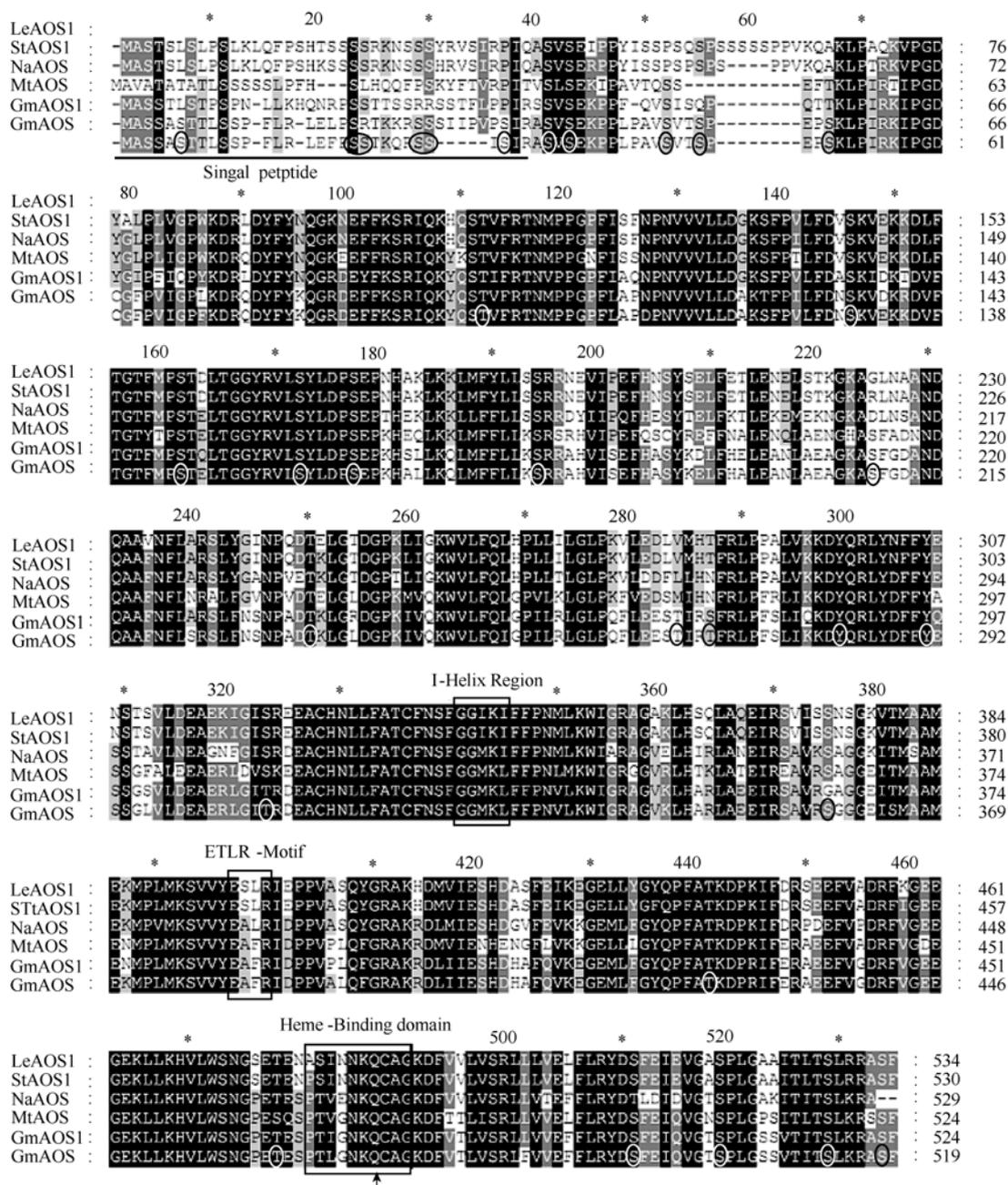


图 2 *GmAOS* 蛋白序列的多重比对

Fig. 2 Multiple alignments of *GmAOS* amino acid sequences

利用软件 Clustal X(Ver.1.81)进行氨基酸序列比对, 比对结果通过 GeneDOC 程序显示。画圈的是预测的丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸磷酸化位点。预测的信号肽序列用黑色下划线标出。高度保守的 I-helix region、血红素结合结构域(C 是血红素结合位点, 用箭头标出)和 CYP74A 酶类高度保守的 ETLR 结构域用黑方框标出。

The deduced amino acid sequence of soybean AOS (*GmAOS*) is compared with the primary structures of AOS from *Lycopersicon esculentum* (LeAOS1, protein ID: CAB88032), *Solanum tuberosum* (StAOS1, protein ID: CAD29735), *Nicotiana attenuate* (NaAOS, protein ID: CAC82911), *Glycine max* (*GmAOS1/GmAOS*, protein ID: ABB91776/ACA79943), *Medicago truncatula* (MtAOS, protein ID: CAC86897). The circled amino acid residues indicate the predicted serine, threonine and tyrosine phosphorylation sites in the *GmAOS* sequence. The predicted chloroplast-targeting signal peptides are underlined. The highly conserved I-helix region, heme-binding domain (the heme-binding C is marked by arrowhead) and the highly conserved ETLR motifs of the CYP74A enzymes are boxed. Aminoacid similarity is based on the ClustalX (version 1.81) convention.

上有多个丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸的磷酸化位点可以通过磷酸化与脱磷酸化调节细胞内已存在酶的“活性酶量”，使细胞对外界刺激做出迅速反应更为有效，充分表明其催化功能的复杂性。

GmAOS 是 P450 超基因家族中特别的一员，被归类为 CYP74A，具有典型的 P450 成员特征又有所变化(图 2)，AOS 是不需要氧气也不需要 NADPH 的 P450 还原酶，表现极高的转换数，对 CO 的亲合力也较低。选取部分已报道的双子叶作物 AOS 蛋白序列与 *GmAOS* 进行序列比对分析，结果显示了 *GmAOS* 基因的 P450 家族特征序列：(1)高度保守的 I-helix region^[12]，该结构域的作用是在血红素表面上形成氧结合袋，它在 P450 家族中的序列为 GXXXT，G 和 T 用于紧密结合氧分子^[13]。大豆 *GmAOS* 中的 GXXXT 转变为 GXXXL，介导氧气结合的保守的 T 没有了，苏氨酸转变为亮氨酸，不能形成氧结合袋，因此不需要氧分子。(2) C 末端有高度保守的血红素结合结构域，P450 家族的血红素保守序列为 FXXGXXCXG，C 是血红素结合位点(用箭头标出)。CYP74A 酶类的该保守区的序列演变为 P-V-NKQCAG 与大多数细胞色素 P450 酶相关的一致性序列有差异。大豆中的该序列转变为 P-L-NKQCAG。(3)具有 CYP74A 酶类高度保守的 ETLR 结构域，ETLR motifs (Glu-Thr-Leu-Arg)是 P450 超基因家族的典型序列，也是 CYP74A 亚家族酶类的保守序列^[14]。在所比对的几个物种中 EALR 取代了 ETLR，在大豆中进一步演变成了 EAFR。

为了进一步了解大豆 *GmAOS* 蛋白可能的功能和在植物 AOS 家族中的进化位置，用 MEGA 程序构建了植物 AOS 家族的系统发生树。从图 3 可以看出，*GmAOS* 与已经报道的 *GmAOS1* 和 *GmAOS2* 亲缘关系最近，与同为豆科的 *MtAOS* 分在双子叶植物一列，都是细胞色素 P450 超基因家族，CYP74A 亚家族中的一员。通过 PredictProtein 蛋白质结构预测，发现 *GmAOS* 的二级结构主要由 β 折叠和 α 螺旋构成(图 4)。

2.3 *GmAOS* 基因启动子序列的分析

为了进一步了解 *GmAOS* 基因的表达调控机制，利用 LA-PCR in vitro cloning kit (TaKaRa, Japan)分离得到 *GmAOS* 基因的启动子片段，该序列为起始密码子(ATG)上游的 472 bp 片段。通过 MaInspector 程序对该区域进行序列分析(图 5)。结果表明在 *GmAOS* 启动子区有 2 个可能的真核生物 RNA 聚合酶 II 识

别位点 TATA-box, 1 个增强转录的 CAAT-box, 1 个响应赤霉素的作用元件(TAACAA), 1 个响应可诱导性抗性基因的作用元件(W box), 2 个响应细菌和盐诱

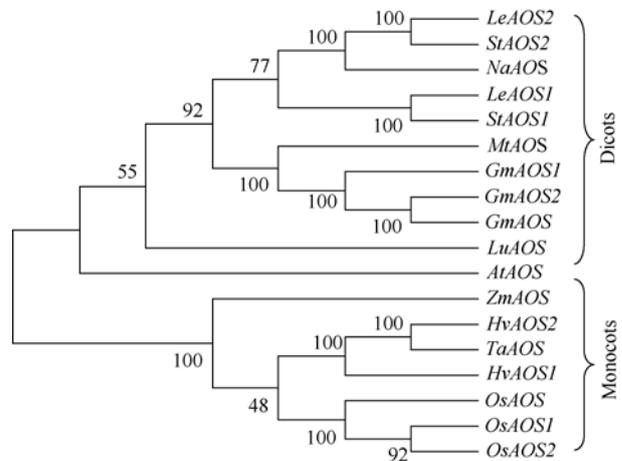


图 3 *GmAOS* 与其他植物 AOS 蛋白的系统发生树
Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of *GmAOS* and other plants AOS 多种作物的 AOS 系统发生树用 MEGA (Ver.4.0)程序构建，树枝上的数字表示 bootstrap 验证中该树枝可信度的百分比，*GmAOS* 与已经报道的 *GmAOS1* 和 *GmAOS2* 亲缘关系最近，归于双子叶植物一列。

The phylogenetic tree is constructed by the MEGA (Ver.4.0). The number above the horizontal lines is percentage of homology among AOS verified by bootstrap. *GmAOS* is closely related to *GmAOS1*/*GmAOS2* and belongs to the dicotyledonous. Accession No. is as follows: *Glycine max* (*GmAOS1*, ABB91776; *GmAOS2*, ABB91777), *Medicago truncatula* (*MtAOS*, CAC86897), *Solanum tuberosum* (*StAOS1*, CAD29735; *StAOS2*, CAD29736), *Lycopersicon esculentum* (*LeAOS1*, CAB88032; *LeAOS2*, AAF67141), *Nicotiana attenuate* (*NaAOS*, CAC82911), *Linum usitatissimum* (*LuAOS*, AAA03353), *Arabidopsis thaliana* (*AtAOS*, CAA6326 6.1), *Zea mays* (*ZmAOS*, AAR33048), *Hordeum vulgare* (*HvAOS1*, CAB86383; *HvAOS2*, CAB86384), *Triticum aestivum* (*TaAOS*, AAO43440), *Oryza sativa* (*OsAOS*, AAL17675).



图 4 *GmAOS* 蛋白二级结构预测
Fig. 4 Protein structure prediction of *GmAOS* protein

ATTTTTGTTAATTAATTGTGTTTAGCTTCCTATTCCTGACTATACAATTACTATAAATATTT
 GA response W box TATA box
 ATGGTATAAACTTTACGATCATCTACTATGTTCTACTTTTTTTTTTTTTTTTCTTGATATAGC
 AACTATGTTTTATTTTCATTTAATTAAGATTGTTTTTTATAAACAGCAAGTTACACGTGCTC
 G-box
 TAGTAAAAAAGAAGAAAAAGGAAGTGTGCACAGTGCCCGGACAGAGCGAGAGG
 pathogen- and salt-induced
 CGAGGCAAGACATGCCGGAAAAAGAAATGATTAATGCACAAATTCACGATTTCGAAC
 pathogen- and salt-induced
 CTTAGGGTCCCATTTTTTCAGGTCAATAAAAAAGACCGCGCTCTTCAATGGTCGCCATT
 CAAT-box
 CAGCTACATAGTACATACACACACACACACAATTCAACTTTTTTCTCTATAAATAAT
 TATA box
 ACTAGTACCCCTTCACCCCTCCATTCCATCATCATTCAACAAAGAAACACCCA
 AAATG

图 5 *GmAOS* 部分启动子序列的分析
Fig. 5 Sequence analysis of partial promoter of *GmAOS*

导的作用元件(GAAAAA)以及 1 个茉莉酸诱导表达所必须的顺式元件(G box)^[15-16]。在启动子区域发现这些元件表明 *GmAOS* 基因在催化功能上具有高度灵敏性。细胞在受到外界刺激时,不但可以通过磷酸化与脱磷酸化控制细胞内已存在酶的“活性酶量”,还可以通过调控不同的响应元件来提高“酶的总量”,因此如果植株中含有较多的 AOS 酶,当植株受到外界侵害时可在短时间内诱导材料提高抗性, *GmAOS* 基因可用于培育高诱导抗性的材料。

2.4 茉莉酸(jasmonic acid)诱导 *GmAOS* 基因的表达分析

据以往报道,茉莉酸是重要的植物激素能启动抗逆基因的表达,逆境条件改变了植物体内源激素的平衡状况,从而导致代谢途径变化,影响植物的抗逆性。在虫害和病毒条件下,植物体内茉莉酸及其衍生物的含量显著增加,这些物质通过激活植物体内相应的防御基因,使植物产生各种类型的化学防御物质,同时诱导植物体内直接防御物质的增加,从而明显提高植物的防御作用^[4]。因为 *GmAOS* 启动子中有茉莉酸诱导表达所必须的顺式元件(G box)^[15-16],本试验研究了 *GmAOS* 与茉莉酸之间的关系。结果表明, *GmAOS* 能强烈响应茉莉酸的诱导(图 6-A),说明 *GmAOS* 在植物激素相互作用的网络中起到了一定作用,且受到诱导 3、6、12 和 24 h 后, *GmAOS* 在黄皮小青豆(高抗)中表达量高于在徐瞳大豆(高感)(图 6-B),即大豆受到茉莉酸诱导后, *GmAOS* 在高抗性材料中的表达高于高感性材料。吴娟娟等^[17]

用斜纹夜蛾诱导黄皮小青豆(高抗)和徐瞳大豆(高感)后也发现, *GmAOS* 在黄皮小青豆(高抗)中达到最大表达量所需要的时间远远短于徐瞳大豆(高感),即 *GmAOS* 与材料的抗性有密切的联系。因此,黄皮小青豆(高抗)与徐瞳大豆(高感)抗虫性的差异可能与 *GmAOS* 基因表达量的不同有关, *GmAOS* 可作为培育高诱导抗性材料的候选基因。

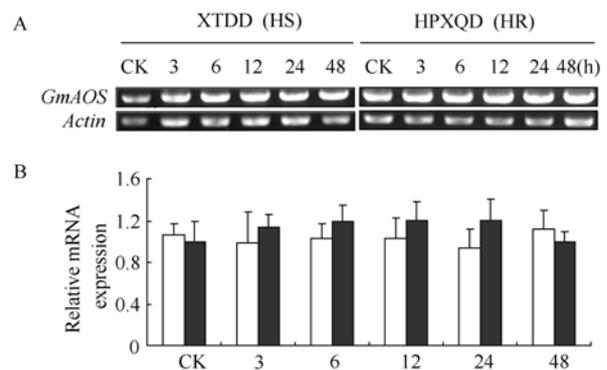


图 6 两种大豆品种叶片中的 *GmAOS* 基因在茉莉酸胁迫下的响应
Fig. 6 Accumulation of the *GmAOS* transcripts in leaves of two soybean varieties treated by jasmonic acid

A: 两种材料按照时间点分别收获叶片, CK 为未处理样品, 提取总 RNA, 做半定量 RT-PCR, 为降低误差, 每份样品做 3 次 PCR, 3 次电泳, 得到相似的实验结果。B: 在茉莉酸胁迫下, *GmAOS* mRNA 的表达水平(相对与 *Actin* 的表达量)。利用 Band Leader 3.0 软件读取 3 次电泳的胶灰度图数据用于做柱状图。白色代表徐瞳大豆(高感); 黑色代表黄皮小青豆(高抗)。

A: leaf tissue was harvested for extraction of total RNA immediately at the time points and CK is the sample without treatment. The experiments were repeated three times and the similar results were obtained; B: mRNA expression of *GmAOS* was represented as the ratio of *GmAOS* band intensity to that of *Actin*. The digitalization of agarose gel analysis was performed with BandLeader (version 3.0) software. XTDD(HS): white histogram; HPXQD(HR): black histogram.

2.5 *GmAOS* 的 Southern blot 分析

为进一步分析该基因与植物的抗逆性的关系, 本文分析了 *GmAOS* 基因在不同抗性材料中是否存在拷贝数的差别, 即质上的差别。用对斜纹夜蛾不同抗性的大豆做了 Southern blot 分析。用 *Xba* I、*Dra* I、*Xho* I 和 *Pvu* II 四个限制性内切酶(目的序列中不含该酶切位点)对大豆基因组进行酶切, 以 *GmAOS* 全长 cDNA 序列为模板标记探针, 结果显示, 在高感的徐瞳大豆中 *GmAOS* 有 2 个拷贝(图 7-A), 在高

抗的黄皮小青豆和野生豆 ZYD3693 中也有 2 个拷贝(图 7-B)。茉莉酸是一种重要的次生代谢物, 是植物受诱导产生的微量可代谢物, AOS 是茉莉酸合成的关键酶, *GmAOS* 基因的拷贝数在 3 种不同抗性材料中不存在差别, 与 AOS 是次生代谢物关键酶的“身份”相符合, 说明该基因只是通过量的变化影响材料的抗性而不是质的变化导致材料抗性的不同, 因此可以通过增加 *GmAOS* 基因量的积累来提高植物的抗逆性。

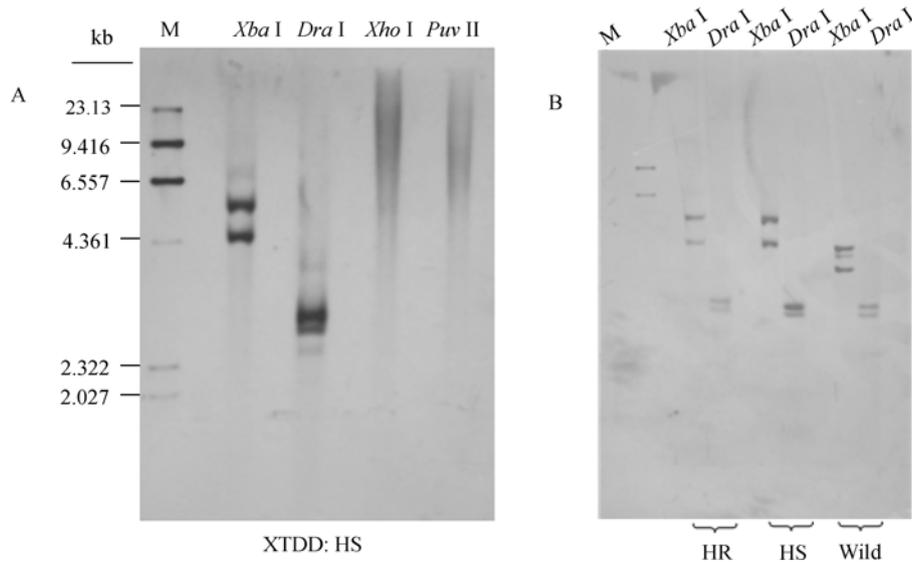


图 7 *GmAOS* 的 Southern blot

Fig. 7 Southern blot of *GmAOS*

A: Southern blot 分析 *GmAOS* 基因在徐瞳大豆(高感)中的拷贝数; B: Southern blot 分析 *GmAOS* 基因在徐瞳大豆(高感)、黄皮小青豆(高抗)和 ZYD3693(野生豆)的拷贝数。

A: Genomic southern blot analysis of *GmAOS* isolated from XTDD(HS); B: Genomic southern blot analysis showing there are two copies of *GmAOS* gene in XTDD(HS), HPXQD(HR), and ZYD3693 (wild soybean).

3 讨论

近年来, 茉莉酸诱导可提高寄主植物抗病虫性一直是国内外的研究热点^[15-16,18], 对一些双子叶模式植物(如拟南芥、番茄、烟草等)的研究表明, 茉莉酸信号传导途径在调节植物虫害有的防御过程中起关键作用。AOS 作为关键酶, 与茉莉酸的生物合成关系密切, 可以通过控制茉莉酸的生物合成而参与调节植物的许多生理过程。目前已经从多种作物中分离得到了 AOS 基因并研究了其功能, 但是关于大豆 *GmAOS* 基因相关研究很少。

本实验室克隆了 *GmAOS* 基因, 分离了 *GmAOS* 基因的启动子序列。*GmAOS* 基因共 1 789 bp 碱基, 编码 519 个氨基酸残基, 没有内含子, 等电点 8.97, 分

子量 58.3 kD。软件分析表明 *GmAOS* 基因的 N 末端显示了典型叶绿体定位信号肽, 这与 Song 在亚麻^[8]中的报道一致。*GmAOS* 基因序列上有多个丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸的磷酸化位点可以通过磷酸化与脱磷酸化控制细胞内已存在酶的“活性酶量”, 使细胞迅速对外界刺激做出有效的反应。*GmAOS* 启动子区有多个可受诱导的调控元件, 当有外界刺激时, *GmAOS* 可以迅速响应, 增加 *GmAOS* “酶的总量”, 通过调控茉莉酸途径, 调动植物体内相关抗逆基因, 降低恶劣环境对植物照成的损害。多个响应元件和磷酸化位点的存在, 表明 *GmAOS* 基因在催化功能上具有高度复杂性, 不但可以通过磷酸化与脱磷酸化控制细胞内已存在酶的“活性酶量”, 还可以通过调控不同的响应元件来提高“酶的总量”。*GmAOS*

能强烈响应茉莉酸的诱导且受到诱导 3、6、12 和 24 h 后, *GmAOS* 在黄皮小青豆(高抗)中的表达量高于徐瞳大豆(高感), 其抗虫性的差异可能是由 *GmAOS* 基因受诱导后的表达量差异引起的, 即 *GmAOS* 与材料的抗性有密切的联系。虽然 *GmAOS* 基因在 3 种不同抗性的大豆材料中均有 2 个拷贝, 但是如果植株中含有较多的活性 AOS 酶总量, 当植株受到外界的伤害时, 仍然可以在短时间内诱导材料提高抗性, 其机理可能是通过调控茉莉酸来控制植株的系统防御, 因此 *GmAOS* 基因可做为培育高诱导抗性材料的候选基因。

4 结论

从大豆中克隆了合成茉莉酸的关键酶 *GmAOS* 基因及其启动子序列, *GmAOS* 基因在 3 种不同抗性的大豆材料中均有 2 个拷贝。*GmAOS* 能强烈的响应茉莉酸的诱导, 且在黄皮小青豆(高抗)中其表达量高于徐瞳大豆(高感), 两种大豆抗虫性的差异, 可能是由 *GmAOS* 基因受诱导后的表达量差异引起的。*GmAOS* 可能与材料的抗性有密切的联系, 可作为培育高诱导抗性材料的候选基因。

References

- [1] Brash A R, Baertschi S W, Ingram C D, Harris T M. Isolation and characterization of natural allene oxides: unstable intermediates in tire metabolism of lipid hydroperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 3382–3386
- [2] Laudert D, Pfarmschmidt U, Lottspeich F, Holländer-Czytko H, Weiler E W. Cloning molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonate. *Plant Mol Biol*, 1996, 31: 323–335
- [3] Laudert D, Weiler E W. Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signaling. *Plant J*, 1998, 15: 675–684
- [4] Xu L(徐涛), Zhou Q(周强), Chen W(陈威). Effects of jasmonic acid signal transduction induced rice resistance to insect. *Chin Sci Bull (科学通报)*, 2003, 48(13): 1442–1446 (in Chinese)
- [5] Sivasankar S, Sheldrick B, Rothstein S J. Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. *Plant Physiol*, 2000, 122: 1335–1342
- [6] Kongrit D, Jisaka M, Iwanaga C, Yokomichi H, Katsube T, Nishimura K, Nagaya T, Yokota K. Molecular cloning and functional expression of soybean allene oxide synthase. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71: 491–498
- [7] Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucl Acids Res*, 1987, 15: 8125–8148
- [8] Song W C, Funk C D, Brash A R. Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 8519–8523
- [9] Maucher H, Hause B, Feussner I, Ziegler J, Wasternack C. Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seeding development. *Plant J*, 2000, 21: 199–213
- [10] Howe G A, Lee G I, Itoh A, Li L, Derocher A E. Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato: cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiol*, 2000, 123: 711–724
- [11] Ziegler J, Keinänen M, Baldwin I T. Herbivore-induced allene oxide synthase transcripts and jasmonic acid in *Nicotiana attenuata*. *Phytochemistry*, 2001, 58: 729–738
- [12] Song W C, Funk C D, Brash A R. Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 8519–8523
- [13] Porter T D, Coon M J. Cytochrome P450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem*, 1991, 266: 13469–13472
- [14] Brash A R, Song W C. Structure-function features of flaxseed allene oxide synthase. *Lipid Med Cell Signaling*, 1995, 12: 275–282
- [15] Farmer E E. Surface-to-air signals. *Nature*, 2001, 411: 854–856
- [16] Ariumra G, Ozawa R. Herbivory induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature*, 2000, 406: 512–514
- [17] Wu J J, Wu Q, Wu Q J, Gai J Y, Yu D Y. Constitutive overexpression of AOS-like gene from soybean enhanced tolerance to insect attack in transgenic tobacco. *Biotechnol Lett*, 2008, 30: 1693–1698
- [18] Berger S. Jasmonate-related mutants of *Arabidopsis* as tools for studying stress signaling. *Planta*, 2001, 214: 497–504